



УКРАЇНА

(19) UA (11) 39109 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/483

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ГІСТОЛОГІЧНОГО ФАРБУВАННЯ

1

(21) u200808994

(22) 09.07.2008

(24) 10.02.2009

(46) 10.02.2009, Бюл.№ 3, 2009 р.

(72) КОПИЦЯ МИКОЛА ПАВЛОВИЧ, UA, ЯКОВЦОВА АНТОНІНА ФЕДОРІВНА, UA, ШАПКІН АНТОН СЕРГІЙОВИЧ, UA, МАРКОВСЬКИЙ ВОЛОДИМИР ДМИТРОВИЧ, UA, ГАРГІН ВІТАЛІЙ ВІТАЛІЙОВИЧ, UA, ГОЛЬЄВА НАТАЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, UA, КАТМІСЬКА ЕЛЕОНОРА ВОЛОДИМИРІВНА, UA

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ТЕРАПІЇ ІМ. Л.Т. МАЛОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", UA

2

(57) Спосіб гістологічного фарбування, у якому гістологічні зрізи різних тканин організму фіксують у рідині, поміщують у парафін, далі гістологічні зрізи депарафінують, промивають у дистильованій воді та послідовно фарбують до виразної появи ядер, цитоплазми та сполучної тканини, який **відрізняють** тим, що як рідину, якою фіксують гістологічні зрізи, використовують 10% розчин формаліну, а ядра, при послідовному фарбуванні гістологічних зрізів, фарбують гемалуїном Майєра, виготовленим за стандартною методою.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, біології, ветеринарії, і може бути використана для фарбування різних тканин організму при їх вивченні у нормі та при патологічних станах.

Відомий спосіб гістологічного фарбування за Ван-Гізона [див. Саркисов Д.С., Петров Ю.Л. Микроскопическая техника. - М. Медицина, 1996, с.544]. Суть відомого способу полягає у тому, що шматки різних тканин організму фіксують у 10% формаліні, виготовляють зрізи товщиною 5-7мкм, депарафінують зрізи, промиті в дистильованій воді, офарблюють у залізнму гематоксиліні Вейгерта протягом 2-х хвилин. Далі зрізи промивають 10 хвилин у проточній воді, просушують фільтрувальним папером і офарблюють пікрофуксином (100мл насиченого водяного розчину пікринової кислоти з 5-10мл 1%-ого водяного розчину кислого фуксину) - 1 хвилину. Обтрушують надлишок розчину й просушують. Диференціюють в 96° спирті, потім занурюють у карбол-кислоту - 5 хвилин, кислоту - 5 хвилин, полістирол.

Результат фарбування: ядра - чорно-коричневі; сполучна тканина - червоно-цегельна; цитоплазма - жовтуватозеленувата.

Застосування даного фарбування є найбільш простим і доступним способом, що дозволяє диференційовано вивчати компоненти стромы й паренхіми. Простота його полягає в дешевизні й доступності реактивів, нескладній методиці

готування розчинів, а також у досить невеликій кількості часу (до 30 хвилин), що витрачається на фарбування матеріалу. Недоліком є те, що червоно-цегельне фарбування сполучної тканини й зеленувато-жовтувате фарбування паренхіми дає задовільний контраст кольорів тільки при збільшенні мікроскопа до 400. При збільшенні рівному 400 і більше, особливо при вивченні структур збагачених сполучною тканиною, і наявністю паренхіматозних елементів з малою щільністю розподілу, замкнених у її основу (наприклад, тканина синусного вузла), контраст кольорів зовсім стирається й можливість диференційовано вивчати компоненти стромы й паренхіми втрачається. Поле зору, у цьому випадку, виглядає зовсім безструктурне й має однорідний цегельного кольору фон сполучної тканини з наявністю зеленуватого відтінку.

Відомий спосіб гістологічного фарбування за Гайденайном [Б. Ромейс Мікроскопична техніка. Москва. Видавництво іноземної літератури. -1953. С.352-354].

Азанове фарбування за Гайденайном винятково гарне як для виявлення сполучної тканини, так і для фарбування паренхіми різних тканин, і тому належить до методів фарбування, що найчастіше застосовується.

Сутність методу полягає в тім, що шматки тканин фіксують у рідині Ценкера або у ценкерформолі за Хеллі, промивають матеріал у проточ-

UA (11) 39109 (13) U

ній воді протягом 24-48 годин, виготовляють зрізи товщиною 5-7мкм, депарафінують зрізи, промивають в дистильованій воді, занурюють у 0,1% розчин азокарміну G. Фарбують у добре закритій посудині у термостаті при 56-60° протягом 45-60 хвилин, а потім охолоджують при кімнатній температурі. Ополоскують у дистильованій воді й диференціюють у 0,1% спиртовому аніліновому розчині до виразної появи ядер (під контролем мікроскопа). Змивають анілін 1% оцетокислим спиртом 0,5-1 хвилину. Протравлюють сполучну тканину в 5% водному розчині фосфорновольфрамкової кислоти протягом 1-3 годин. Ополоскують у дистильованій воді 1 хвилину й офарбовують у розчині анілінового синього-оранжевого - оцтової кислоти 1-3 години. Промивають у воді, диференціюють в 96° спирт, потім занурюють у карбол-ксілол - 5 хвилин, ксілол - 5 хвилин, полістирол.

Результати фарбування: сполучна тканина різко синя, ядро червоне, цитоплазма кліток різних тканин червонувата до оранжевої.

Достойністю даного способу фарбування є його стійкість та гарний контраст кольорів між синьою сполучною тканиною й цитоплазмою від червоної до оранжевої. Недоліками відомого способу є його тривалість, що зумовлено надзвичайно довгим промиванням матеріалу у воді після фіксуєчих сумішей, час самого фарбування триває за мінімальними підрахунками від 4,5 годин до 8 годин за максимальними підрахунками, що змушує лаборанта витрачати велику кількість часу свого робочого дня. Крім цього близькість кольорової гами фарбування ядра й цитоплазми не дозволяє чітко розрізняти дані структури.

Відомий також спосіб гістологічного фарбування, запропонований Маллорі для фарбування сполучної тканини та паренхіми. [Основы цитологической диагностики и микроскопическая техника: Учебное пособие для ВУЗов / Н.Ю. Полонская, О.В. Егорова. // М.: Издательский центр "Академия". - 2005. - 160с., Б. Ромейс Мікроскопічна техніка. Москва. Видавництво іноземної літератури. - 1953. - С.352].

Даний спосіб фарбування є найбільш близьким за технічною сутністю й результатами до способу, що заявляється, тому він обраний за прототип.

Суть прототипу полягає в тім, що шматки тканин фіксують у рідині Ценкера або у ценкер-формолі за Хеллі - не менш, ніж 24 години, виготовляють зрізи товщиною 5-7мкм, депарафінують зрізи, промивають в дистильованій воді - 0,5 хвилини, офарблюються у 0,1% водному розчині кислотного фуксину - 3 хвилини. Промивають у воді й 1%-ною фосфорномолібденовою кислотою, 3-5 хвилин. Далі промивають у воді - 2 хвилини, офарблюють у розчині анілінового синього - оранжевого - шавлевої кислоти - 3-5 хвилин. Промивають у воді, диференціюють в 96° спирті, потім занурюють у карбол-ксілол - 5 хвилин, ксілол - 5 хвилин, полістирол.

Результат фарбування: сполучна тканина темно-синя, цитоплазма від яскраво-оранжевої до

червонуватої, ядра від червонуватого до жовтуватого.

Достойностями даного методу є простота виконання, доступність реактивів і досить чіткий контраст кольорової гами між синьою сполучною тканиною й червоно-оранжевою паренхімою. Однак, істотним недоліком є те, що для досягнення найкращих результатів при роботі за зазначеною методикою більш за все показана фіксація матеріалу в хромово-сулемових рідинах: рідина Ценкера й ценкер-формол за Хеллі або Максимовим. Але сулема, яка входить до складу цих фіксуєчих сумішей, є дуже токсичною речовиною, тому застосування цього способу гістологічного фарбування обмежене. Іншим недоліком даного методу є близька кольорова гама червоно-жовтуватих ядер і оранжевої цитоплазми, що обмежує чіткість та унеможливує вивчення стану ядра й внутрішньоядерних структур.

В основу корисної моделі покладено завдання створити такий спосіб гістологічного фарбування, у якому не змінюючи якість фарбування строми та паренхіми, досягти чіткого контрасту кольорової гами ядер та цитоплазми, що забезпечить можливість більш об'єктивно вивчати морфологічні зміни строми та паренхіми, ядер та додатково внутрішньоядерних структур при різних патологічних станах.

Це завдання вирішується у способі гістологічного фарбування, що заявляється, у якому гістологічні зрізи різних тканин організму фіксують у рідині, заключають у парафін, далі гістологічні зрізи депарафінують, промивають у дистильованій воді та послідовно фарбують до виразної появи ядер, цитоплазми та сполучної тканини.

Ознаками, що відрізняють корисну модель від прототипу, є:

- у якості рідини, якою фіксують гістологічні зрізи різних тканин організму, використовують 10% розчин формаліну;
- ядра, при послідовному фарбуванні гістологічних зрізів, фарбують гемалуїном Майєра, виготовленим за стандартною методою.

Спосіб гістологічного фарбування тканин, що заявляється, відпрацьовували у Харківському Національному медичному університеті й в ДУ "Інститут терапії ім. Л.Т. Малої АМН України" на зрізах різних тканин людини й тварин (56 експериментів при гістологічному фарбуванні).

Саме за даними власних оригінальних досліджень у корисній моделі, що заявляється, завдяки фіксації тканин у 10% формаліні та офарбленню ядра гемалуїном Майєра у сукупності з відомим із прототипу офарбленням сполучної тканини та цитоплазми розчином анілінового синього з оранж G досягається одночасне й диференційоване вивчення ядра, цитоплазми, сполучної тканини та додатково ядерця на основі чітко помітної кольорової гами кожного з перерахованих об'єктів.

Переваги способу гістологічного фарбування, що заявляється, у порівнянні з прототипом надаються у таблиці 1

Таблиця 1

Переваги способу, що заявляється, над відомим

№№ п/п	Показники, що порівнюються	Прототип	Спосіб, що заявляється
1.	рідина, якою фіксують гістологічні зрізи	хромово-сулемові суміші	10% формалін
2.	послідовно фарбують до виразної появи ядер, стромы та паренхіми, при цьому ядро фарбують:	0,1 % водний розчин кислотного фуксину	гемалуїн Майєра
3.	колір, у який фарбується ядро	червоно-жовтуватий	фіолетовий
4.	Колір, у який фарбується ядерце	не розрізняється	червоно-оранжевий
5.	Колір, у який фарбується цитоплазма	червоно-оранжевий	червоно-оранжевий
6.	ефективність гістологічного фарбування	відсутній чіткий кольоровий контраст між ядром та цитоплазмою та неможливість розрізнити ядерце	чіткий контраст кольорової гами між ядром, ядерцем та цитоплазмою, що досягається фарбуванням ядра гемалуїном Майєра

Ступінь відтворюваності способу гістологічного фарбування - 95%.

Спосіб, що заявляється, здійснюється в такій послідовності:

Для вивчення морфологічних змін різних тканин організму та їх компонентів (сполучної тканини, цитоплазми, ядра та ядерця), згідно корисній моделі, шматки тканин фіксують у 10% формаліні - не менш, ніж 24 години;

Заключають їх у парафін. Виготовляють гістологічні зрізи товщиною 5-7мкм, які, далі депарафінують, та промивають у дистильованій воді - 0,5хвилини. Згідно корисній моделі Депарафіновані зрізи з дистильованої води переносять у гемалуїн Майєра, офарблюють 3 хвилини;

Промивають у водопровідній воді протягом 3 хвилин;

Занурюють зрізи в 5% розчин фосфорновольфрамової кислоти на 1 хвилину.

Промивають у дистильованій воді - 0,5 хвилини;

Офарблюють у розчині анілінового синього й оранж G, оцтової кислоти - 2хвилини. Промивають у дистильованій воді - 0,5 хвилини;

Споліскують у 96° спирті, потім занурюють у карбол-ксилол - 5 хвилин, ксилол - 5 хвилин, полістирол.

Результат фарбування: сполучна тканина темно-синя; цитоплазма яскраво-оранжева, ядра чітко фіолетові; ядерця червоно-оранжеві;

Можливість здійснення запропонованого способу гістологічного фарбування підтверджується прикладами.

#### Приклад 1

Фарбування міокарда людини. Результат: сполучна тканина яскраво-синя, цитоплазма оранжева, ядро фіолетове, ядерце оранжеве (Фіг.1).

#### Приклад 2

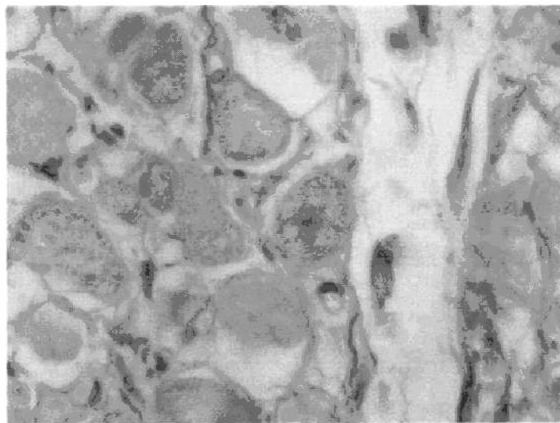
Фарбування тканини нирки криси. Результат: сполучна тканинна основа гломерул та інтерстиція ярко-синя, мезангій оранжевий, цитоплазма епітелію каналців яскраво-оранжева, ядра фіолетові, ядерця оранжеві (Фіг.2).

#### Приклад 3

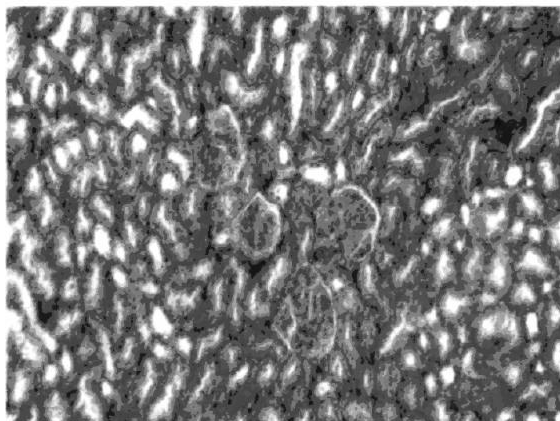
Фарбування тканини провідної системи серця людини. Результат: сполучна тканина яскраво-синя, цитоплазма оранжева, ядро фіолетове, ядерце оранжеве. Гарно видно вакуолізацію ядра та цитоплазми (Фіг.3).

У корисній моделі, що заявляють, завдяки фіксації тканин у 10% формаліні та офарблення ядра гемалуїном Майєра у сукупності з відомим із прототипу офарбленням сполучної тканини та цитоплазми розчином анілінового синього з оранж G досягається одночасне й диференційоване вивчення ядра, цитоплазми, сполучної тканини та додатково ядерця на основі чітко помітної кольорової гами кожного з перерахованих об'єктів.

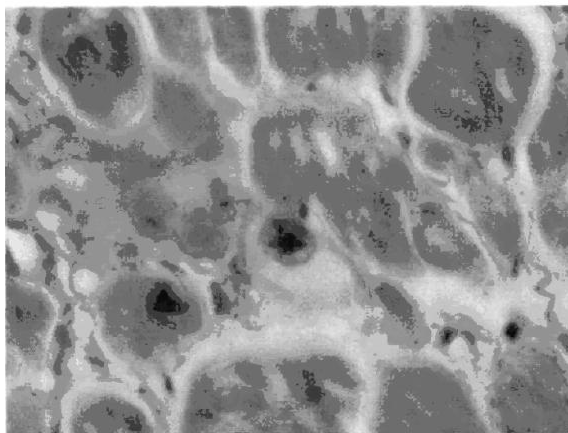
Даний спосіб є не складним у виконанні, швидким, реактиви недорогими й доступними, а як фіксуюча речовина використовується найпоширеніший 10% формалін, що не впливає на якість фарбування. Даний спосіб дозволяє більш виразно й доступно вивчати морфологічні зміни в тканинах і клітках при різних патологічних станах.



Фіг.1



Фіг.2



Фіг.3